

**WO 2005/087921 A1**



(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

---

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung bezieht sich auf ein verfahren und auf die entsprechende Anlage zur Gewinnung und/oder Verkapselung von lebenden Zellen aus Organen. Dabei wird das Organ, das die Zellen enthält in einem ersten Schritt in einem enzymatischen Prozess in Einzelzellen oder Zellverbände zerlegt. Aus dem erhaltenen Zellgemisch werden danach die relevanten Zellen Isoliert. Die so gewonnenen Zellen können anschließend verkapselt werden. Die Erfindung beschreibt einen technischen Prozess und eine Anlage die diese drei Schritte in sich vereint.

## Beschreibung

### Technischer Prozess sowie Anlage zur Gewinnung und/oder Verkapselung von lebenden Zellen aus Organen

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und auf die entsprechende Anlage zur Gewinnung und/oder Verkapselung von lebenden Zellen aus Organen. Dabei wird das Organ, das die Zellen enthält in einem ersten Schritt in einem enzymatischen Prozess in Einzelzellen oder Zellverbände zerlegt. Aus dem erhaltenen Zellgemisch werden danach die relevanten Zellen isoliert. Die so gewonnenen Zellen können anschließend verkapselt werden. Die Erfindung beschreibt einen technischen Prozess und eine Anlage die diese drei Schritte in sich vereint.

In der Medizin oder Pharmazie aber auch in der technologischen Praxis ist es immer häufiger erforderlich lebende Zellen einzusetzen. Um deren Handhabbarkeit und auch Haltbarkeit zu verbessern werden diese in verkapselter Form verwendet.

So werden beispielsweise bei der Medikamentenentwicklung die Wirkstoffe auf ihre Wirkung in der Leber hin untersucht. Dies erfordert aufwendige Tierversuche und teure klinische Tests. Obwohl Leberzellen aus der Fleischindustrie in großen Mengen zur Verfügung stehen, ist die Entwicklung eines Testkits auf der Basis isolierter Leberzellen bisher gescheitert, da Einzelzellen nur einige Stunden am Leben bleiben. Durch eine Isolation der Zellen aus der Leber und einer anschließenden Verkapselung ist es möglich, die Zellen so zu präparieren, dass sie mehrere Wochen am Leben bleiben, wodurch sie erstmals im Rahmen von Standard-Testkits für toxikologische Untersuchungen eingesetzt werden können.

Ein anderer Ansatz besteht darin Krankheiten wie beispielsweise den Diabetes Mellitus mit Hilfe der Transplantation von lebenden, verkapselten Inselzellen zu therapieren. Die Zellen werden aus dem Organ isoliert und so verkapselt, dass sie vor dem körpereigenen Immunsystem geschützt sind. Auf diese Weise kann man artfremde Zellen transplantieren. Verkapselt man z.B. Schweine-Inselzellen und spritzt diese einem zuckerkranken Patienten, so würden die Zellen nicht nur das erforderliche Insulin produzieren, sondern auch den Blutzucker regeln. In der Literatur sind eine ganze Reihe derartiger Versuche beschrieben.

Bei all diesen Vorhaben müssen in einem ersten Schritt die Zellen aus dem Organ gewonnen also isoliert werden. Bislang haben sich zwei grundlegend verschiedenen Methoden in der Laborpraxis durchgesetzt: 1. Ein Zerkleinern des Organs mit mechanischen Mitteln und anschließendes Aufarbeiten der erhaltenen Zell- und Gewebssuspension. 2. Ein

enzymatisches Zerlegen des Organs in Einzelzellen und anschließendes Abtrennen der relevanten Zellen aus dem Gemisch.

In der US-Anmeldung US 5,079,160 beispielsweise, wird ein Verfahren zur Gewinnung von lebenden Zellen aus Organen von Säugetieren beschrieben. Dies geschieht dergestalt, dass in einem ersten Schritt durch ein Enzym das Bindegewebe des Organs zerstört wird, wobei die einzelnen Zellen freigesetzt werden. Durch Abkühlen wird das Enzym inaktiviert. Die Zellsuspension wird anschließend in einem Dichtegradienten aufgetrennt. Die Patentschrift beschreibt auch eine Laboranordnung zu diesem Zweck. Nach dem hier dargestellten Verfahren und mit der dargestellten Laboranordnung ist ein Auftrennen der Organe in im technischen, automatisierten Verfahren nicht möglich. Auch werden keine Angaben zu einer nachträgliche Verkapselung der Zellen gemacht.

Um die Zellen oder Zellverbände handhabbar zu machen ist es gängige Praxis sie anschließend zu verkapseln. Um dies zu erzielen werden sie in einem ersten Schritt einer flüssigen, zumeist wasserlöslichen Grundsubstanz beigemischt, die dann durch geeignete Vorrichtungen vertropft wird. Die gebildeten Tropfen werden ausgehärtet und schließen den in ihnen gelösten oder suspendierten Stoff oder die Zellen mit ein. Dies wird in der Regel durch ein Vernetzen in einem Fällbad oder durch Änderung physikalischer Parameter erreicht. Die so gebildeten Kügelchen deren Durchmesser in einem Bereich von einigen Mikrometern bis einigen Millimetern liegt, können anschließend beschichtet werden.

In der Fachliteratur werden an mehreren Stellen Verfahren beschrieben, die eine Verkapselung lebender Zellen zum Gegenstand haben. So beschreibt z.B. G.Troost et.al. (G.Troost et. al. Sekt, Schaumwein, Perlewein, Stuttgart 1995) in Alginat-Kugeln immobilisierte Hefe zur Flaschengärung bei der Schaumweinherstellung. Hierdurch kann das zeitaufwendige, manuelle Abrütteln des Hefedepots durch das rasche Absinken der Kügelchen in der Sektfflasche ersetzt werden. Eine Gewinnung der Zellen aus Organen ist hier, da nicht erforderlich nicht beschrieben.

F. Lim und A. Sun beschreiben in der Zeitschrift „Science Band 210, Seiten 908-910, Jahrgang 1980 eine Kapsel mit einer semipermeablen Membran zur Immobilisierung von lebenden Zellen bei der der Kapselkern aus einer einzigen Schicht eines Poly-L-Lysin / Alginatkomplexes umgeben ist. Bei diesen Kapseln wird ein Austreten der Zellen aus dem Kapselkern verhindert. Diese Membrankapsel eignet sich wegen ihrer relativ geringen mechanischen Stabilität nicht zum Einsatz in technischen Prozessen. Auch können darin

die Membran dafür durchlässig ist. Diese Methode ist auch Gegenstand der US-Anmeldung US 4,323,457. Sie ist in der dargestellten Form nicht für einen technischen Prozess geeignet und befasst sich auch nicht mit der Zellgewinnung.

In der Patentschrift P 43 12 970.6 wird eine Membrankapsel beschrieben, die auch zur Immobilisierung von Enzymen und Proteinen, aber auch lebenden Zellen geeignet ist. Hier ist der Kern, der das Immobilisat enthält mit einer mehrlagigen Hülle umgeben, wobei jede dieser Lagen der gesamten Hülle eine gewisse Eigenschaft verleiht. Über die vorteilhafte Wahl der Hüllenpolymere kann die Durchlässigkeit der Membran so verringert werden, dass auch Enzyme in der Kapsel bleiben, während die viel kleineren Substrate und Produkte die Membran passieren können. Diese Kapseln können aber bislang nur im Labormaßstab, also in kleinen Mengen hergestellt werden. Auch fehlt hier der Hinweis auf eine Methode zur Zellgewinnung.

All diese Verfahren haben entweder immer nur einen Schritt des Prozesses, also entweder die Zellgewinnung oder die Verkapselung zum Gegenstand oder aber sie sind nur für den Labormaßstab also nicht für ein technisches Verfahren geeignet.

Ausgehend von dieser Sachlage liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, einen Verfahren sowie die dazugehörige Anlage zu beschreiben, die es erstmals ermöglicht, lebende Zellen aus einem Organ in einem technischen Prozess zu gewinnen, aufzutrennen und zu verkapseln.

Der erfindungsgemäße Herstellungsprozess gliedert sich in drei Abschnitte, die Zellgewinnung, die Zelltrennung und die Zellverkapselung:

Das Organ aus dem die Zellen gewonnen werden, wird in einem ersten in Einzelzellen zerlegt. Dies geschieht in einem enzymatischen Prozess, wie er vom Prinzip her literaturbekannt ist. In einem zweiten Verfahrensschritt wird die erhaltene Zellsuspension im aufgetrennt. Dabei wird die für die weitere Verarbeitung relevante Zellsorte mit Hilfe einer Antikörpermarkierung aus dem Gemisch abgetrennt. Sollte eine Verkapselung der erhaltenen Zellen erforderlich sein, kann dies in einem weiteren Verfahrensschritt erfolgen. Die Verkapselung basiert auf dem Prinzip wonach die relevanten Zellen in einem ersten Schritt einer flüssigen, zumeist wasserlöslichen Grundsubstanz beigemischt werden, aus der dann durch Vertropfen und Aushärten mechanisch stabile, beschichtbare Partikel gewonnen werden.

eine Maschine, der ein solcher Prozess zu Grunde liegt, besteht demnach aus drei Modulen, je eines für jeden Verfahrensschritt: Zellgewinnung, Zelltrennung und Zellverkapselung.

Fig. 1 und Fig. 1a zeigen den Grundaufbau einer Anlage bei der dem das erfindungsgemäße Verfahren umgesetzt wurde. Alle Komponenten der Maschine sind so gefertigt, dass die Anlage durch Autoklavieren sterilisiert werden kann. Die Zellgewinnung erfolgt durch eine Zerlegung des Organs in Einzelzellen und/oder Zellverbände. Dies geschieht im Modul ZI. Der genaue Aufbau und die Funktionsweise des Zellisolutionsmoduls (ZI) ist in Fig. 2 dargestellt und wird nachfolgend eingehend erläutert. Nach der Isolation gelangt das Zellgemisch in das Zelltrennmodul ZT. Der Aufbau des Moduls zur Zelltrennung ZT ist in Fig. 3 schematisch dargestellt, seine Funktionsweise wird an einer nachfolgenden Stelle beschrieben. Eine nachträgliche Verkapselung der relevanten Zellen kann mit Hilfe des Moduls ZVK durchgeführt werden. Der Aufbau dieses Moduls ist in Fig. 4 dargestellt ist und seine Funktionsweise wird in einem der nachfolgenden Abschnitte erklärt.

Fig. 2 zeigt in einer schematischen Darstellung das Zellisolutionsmodul (ZI) der Anlage. Es funktioniert folgendermaßen: Das Organ eines frisch verstorbenen, beispielsweise tierischen Spenders wird in der Reaktionskammer RK auf die Siebplatte F1 gelegt. Aus dem Vorratsbehälter EV wird anschließend über die Dosierpumpe (z.B. eine Korbepumpe) P2 eine Enzymlösung dem Organ zugeleitet. Ein solches Enzym kann z.B. eine Collagenase sein. Die Maschine ist so konstruiert, dass die Reaktionskammer herausnehmbar ist, so dass das Organ unter sterilen Bedingungen in der Kammer platziert werden kann und dass die Enzymlösung bei Bedarf über eine Zuleitung direkt in ein Blutgefäß des Organs geleitet werden kann. Die Reaktionskammer RK ist Teil eines geschlossenen Kreislaufs in dem sie während des ganzen Zellisolutionsvorgangs von einem Zellnährmedium durchspült wird. Dieses Medium wird aus dem Vorratsbehälter MV über die Pumpe P1 und über die Ventile V2 und V1 in dem Wärmetauscher WT1 auf ca. 35 - 38°C erwärmt und in die Kammer RK geleitet. P1 kann beispielsweise eine Zahnradpumpe oder eine andere selbstansaugende Pumpe mit abnehmbarem Pumpenkopf sein. Der Pumpenkopf kann so zusammen mit dem Rest der Maschine autoklaviert werden. Der Wärmetauscher WT1 ist an einen Heizthermostat HT angeschlossen, der über den Temperaturfühler TF1 die Temperatur in der Kammer RK ermittelt und auf ca. 35 - 38° C regelt. Bei dieser Temperatur ist das Enzym, die Collagenase nämlich aktiv und zersetzt das Bindegewebe des Organs, wodurch die einzelnen Zellen herausgelöst und freigesetzt werden. Um diesen Vorgang zu unterstützen wird im Inneren der Kammer RK durch den Rührantrieb RA eine turbulente Verwirbelung des Nährmediums erzeugt.

Die frei gewordenen Zellen werden von dem Nährmedium erfasst, das die Kammer RK durchströmt und über den Wärmetauscher WT2 in die Dekantierkammer DK geleitet. Bei diesem Vorgang wird das Nährmedium mit den Zellen auf ca. 3 – 8 °C abgekühlt, wodurch das Enzym, die Collagenase inaktiviert wird. Die Temperatur wird durch den Kältethermostat KT geregelt. Der Thermostat KT ist mit dem Temperaturfühler TF 2 verbunden, der laufend die Temperatur in der Dekantierkammer DK ermittelt und auf ca. 3 - 8 °C regelt. Das Einleitrohr des Nährmediums (mit Zellen) wird in das Innere der Dekantierkammer DK durch die Filterfritte F2 hindurch geführt. Diese Filterfritte besteht z.B. aus Edelstahl und hat eine Porosität die geringer ist als der Durchmesser der aus dem Organ herausgelösten Zellen (z.B. 5  $\mu\text{m}$ ). Auf diese Weise werden die Zellen aus dem Nährmedium abgetrennt und sammeln sich unterhalb der Fritte. Die Fritte ist für das Nährmedium durchlässig. Dieses wird oberhalb der Fritte wieder abgepumpt und gelangt über eine entsprechende Stellung des Ventils V2 und V1 wieder zurück in den Kreislauf. Im Kreislauf befindet sich auch noch ein Druckschalter DS der bei einem Zusetzen der Filterfritte F2 und somit einem übermäßigen Druckanstieg im System die Pumpe P1 entsprechend steuert. Durch Öffnen des Ventils V3 werden die isolierten Zellen als Zellsuspension ZSR aus der Dekantierkammer geleitet und können dem Zelltrennmodul ZT zugeführt werden. Soll die Anlage gereinigt werden, wird über V2 die entsprechende Spüllösung angesaugt und durch das System gepumpt. Nach einem Durchlauf kann die Spüllösung durch Öffnen von V1 aus dem Kreislauf entfernt werden.

Die durch die Zellisolation gewonnene Suspension ZSR ist ein Gemisch aus unterschiedlichen Zelltypen. Für manche Anwendungen kann die Suspension in dieser Form eingesetzt werden. In der Regel muss jedoch aus dem Gemisch eine bestimmte Zellsorte abgetrennt werden. Methoden zur Auftrennung von Zellgemischen werden in der Literatur an mehreren Stellen beschrieben. Neben der klassischen Trennmethode in einem Dichtegradienten gefolgt von einem Abzentrifugieren der einzelnen Fraktionen setzt sich immer mehr die Trennung mit magnetisch markierten Antikörpern durch. Bei diesem Verfahren werden spezifische Antikörper eingesetzt, die magnetische Partikel enthalten. Diese Antikörper setzen sich auf bestimmten Zelltypen fest, machen diese magnetisch wodurch sie in einem Magnetfeld aus dem Zellgemisch herausgetrennt werden können. Werden alle Zellen markiert außer einem bestimmten Zelltyp spricht man von einer Negativmarkierung. Im Umgekehrten Fall, bei dem nur ein gewisser Zelltyp markiert wird handelt es sich um eine Positivmarkierung.

Die vorliegende Erfindung nutzt zur Auftrennung des aus dem Modul ZI gewonnenen Suspension die Methode mit spezifischen, magnetischen Antikörpern. Dieser

Verfahrensschritt ist im Modul ZT technisch umgesetzt. Der Aufbau dieses Moduls ist in Fig. 3 schematisch dargestellt.

Das Zelltrennmodul aus Fig. 3 arbeitet wie folgt: Die Rohsuspension ZSR aus ZI wird in einem Behälter ZS aufgefangen. Hier wird der magnetisch markierte Antikörper aus MP zudosiert. Dieser Antikörper kann je nach weiterer Verwendung der Zellen entweder eine Positiv- oder eine Negativmarkierung bewirken. Als Beispiel wird bei der weiteren Beschreibung von einer Negativmarkierung ausgegangen. Das so markierte Zellgemisch wird durch die Pumpe P3 in die Trennkammer TK gepumpt. P3 ist beispielsweise eine Schlauchpumpe oder jede andere, die aufgrund ihrer Bauart zum Pumpen von Zellsuspensionen geeignet ist. Die Trennkammer besitzt Kanäle, durch die die Suspension geleitet wird. Unterhalb der Kammer befindet sich ein Magnet M. Ist dieser Magnet ein Permanentmagnet besitzt die Kammer einen Mechanismus, der ein Entfernen des Magneten ermöglicht (SRT). Ist der Magnet ein Elektromagnet besitzt dieser eine Steuerung (SRT) mit Hilfe derer er zu- oder abgeschaltet werden kann. Die markierte Zellsuspension wird in der Kammer einem Magnetfeld ausgesetzt wodurch die markierten Zellen zurückgehalten werden. Über VT werden bei einer Negativmarkierung nur noch die für die weitere Verarbeitung relevanten Zellen von der Flüssigkeit transportiert. Man erhält eine sortenreine Zellsuspension ZS2 in Zellnährmedium. Durch Entfernen des Magnetfeldes werden nun auch die markierten Zellen von der Flüssigkeit weitertransportiert und über ein Umstellen des Ventils VT als Zellsuspension ZS1 ausgespült.

Die erhaltenen Zellen können direkt als Suspension ZS1 oder ZS2 verwendet werden. Bei einer ganzen Reihe von Zellen ist es aber von Vorteil, sie in einem weiteren Schritt zu verkapseln. Auf diese Weise kann die Haltbarkeit der Zellen erhöht und deren Handling verbessert werden.

In Fig. 4 ist das Zellverkapselungsmodul ZVK der Prozesses schematisch dargestellt. Es erlaubt eine Verkapselung der Zellen sowohl in sogenannten Membrankapseln aber auch in membranlosen Kapseln. Die Zellsuspension ZS2 wird in einem Mischgefäß MI, das mit einem Rührantrieb RA2 ausgestattet ist in einer Grundstofflösung GL, vorzugsweise Natriumalginat suspendiert oder gelöst. Diese Grundstoffsuspension oder -lösung wird danach in dann über V8 in den Druckbehälter DB und von da über V3 in den Verkapselungsreaktor VR befördert. Dies kann entweder wie in Fig. 3 gezeigt durch Druckluft erfolgen (Regelung über das Ventil DRV und Manometer M), es können aber auch Pumpen, Förderschnecken usw. verwendet werden. Aus dieser Suspension oder Lösung werden dann durch Eintropfen mit Hilfe des Düsenkopfes DSK in ein Fällbad, Kügelchen geformt. Dies



kann entweder durch Komplexieren mit einer mehrwertigen Salzlösung wie z.B. bei der Verwendung von Alginat erfolgen, oder durch die Änderung physikalischer Parameter wie z.B. Temperatur bei anderen Grundstoffen. Zum Vertropfen der Flüssigkeit können je nach gewünschter Größe, Produktivität und Größenverteilung mehrere Verfahren eingesetzt werden. Hierbei können entweder Düsen Verwendung finden, die Kapillaren besitzen, bei denen der Tropfen über einen Luftstrom abgerissen wird oder aber auch solche bei denen der Tropfenabriss über Vibration, elektrostatische Ablenkung usw. erfolgt.

Beim Eintauchen ins Fällbad wird der Flüssigkeitstropfen zum Gel und schließt das zu verkapselnde Material ein. Das benötigte Fällreagens wird vor Beginn des Tropfvorgangs über die Ventile V4, V6, V7 mit Hilfe der Pumpe P4 aus dem Vorratsbehälter VB1 in den Verkapselungsreaktor befördert. Durch eine tangentielle Einleitung der Flüssigkeit auf zusätzliches Rühren verzichtet werden. Während des Vertropfens wird das Fällreagens über eine geeignete Stellung der Ventile V6 und V7 mit Hilfe der Pumpe P4 im Kreis geführt. Nach Beendigung des Vertropfens und des Aushärtens der Partikel wird das Fällreagens über die Ventile V6, V7 und V5 wieder in den Behälter VB1 zurückgepumpt. Ist das Reagens verbraucht kann es auch durch eine entsprechende Stellung von V5 verworfen werden. Danach wird über die Ventile V4, V6 und V7 eine Waschlösung in den Reaktor VR gepumpt, wodurch die Kügelchen von dem überschüssigen Fällreagens befreit also gewaschen werden.

Ist eine Beschichtung der Kügelchen gewünscht können in einem ähnlichen Vorgang aus den Vorratsbehältern VB2, VB3 usw. die entsprechenden Beschichtungslösungen in den Reaktor VR gepumpt und daraus wieder entfernt werden. Die Beschichtung der Gelpartikel erfolgt durch deren Kontakt mit den jeweiligen Beschichtungslösungen. Dies sind verdünnte wäßrige Lösungen von Polymeren mit anionischen bzw. kationischen Gruppen wie z.B. Chitosan, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenimin, Carbocymethylcellulose, Alginat, Polyacrylsäure usw. die auf der Kapseloberfläche sogenannte Polyelektrolytkomplex-Schichten bilden. Durch wiederholtes Eintauchen der Partikel in diese Lösungen werden, wie in P 43 12 970.6 beschrieben, mehrere Lagen der Kapselhülle gebildet.

Die verkapselten Zellen werden über das Ventil AV2 aus dem Reaktor VR als Suspension ZK ausgeschwemmt. Je nach späterem Einsatzgebiet können die Kapseln danach entweder inkubiert, eingefroren oder getrocknet werden.

### Patentansprüche

1. Verfahren und Anlage zur Gewinnung und/oder Verkapselung von lebenden Zellen aus Organen **dadurch gekennzeichnet**, dass das Organ, das die Zellen enthält in einem enzymatischen Prozess in Einzelzellen und/oder Zellverbände zerlegt wird, aus dem so erhalten Zellgemisch anschließend die relevanten Zellen abgetrennt werden und diese danach verkapselt werden können.
2. Verfahren nach Anspruch 1 **dadurch gekennzeichnet**, dass es mehrere oder alle der folgenden Schritte umfasst, die auch mehrmals wiederholt werden können:
  - Umspülen eines Organs mit einer auf ca. 35 – 38° C erwärmten Nährflüssigkeit
  - Herausstreifen von Zellen aus dem Organ mit Hilfe eines Enzyms
  - Weitertransport der herausgelösten Zellen durch die Nährflüssigkeit in Form einer Suspension
  - Abkühlen der dadurch resultierenden Zellsuspension auf ca. 3 – 8° C
  - Aufkonzentrieren der Zellsuspension durch ein Abtrennen der Zellen aus der Suspension mit Hilfe einer porösen Fritte
  - Rückführen der Nährflüssigkeit nach Abtrennung der Zellen in einen Kreislauf
  - Markieren bestimmter Zelltypen in der konzentrierten Suspension mit Hilfe magnetisch markierter Antikörper
  - Abtrennen der so markierten Zellen aus der Suspension in einem Magnetfeld
  - Suspendieren der relevanten Zellfraktion in einem Grundstoff
  - Vertropfen dieser Grundstoff Suspension
  - Fällen der Tropfen
  - Spülen und Suspendieren der durch Fällung entstandenen Kügelchen in einer Waschflüssigkeit
  - Umspülen der Kügelchen mit einer polykationischen Polymerlösung und Ausbilden einer kationischen Ladung auf der Kugeloberfläche
  - Waschen der Kügelchen mit einer Waschflüssigkeit
  - Waschen der Kügelchen mit einer Detergenzlösung
  - Umspülen der Kügelchen mit einer polyanionischen Polymerlösung und Ausbilden einer anionischen Ladung auf der Kugeloberfläche

- Spülen und Suspendieren der durch Fällung entstandenen Kügelchen in einer Waschflüssigkeit
  - Suspendieren der durch Fällung entstandenen Kügelchen mit den Zellen in einem Zellnährmedium
  - Inkubieren der Kügelchen mit den Zellen
  - Einfrieren der Kügelchen mit den Zellen
  - Trocknen der Kügelchen mit den Zellen
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet dass das zur Zellisolation eingesetzte Enzym eine Collagenase ist
  4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3 dadurch gekennzeichnet, dass der Grundstoff in den die Zellen zur Verkapselung eingerührt werden ein löslicher Naturstoff oder Kunststoff ist.
  5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, dass der Grundstoff durch ein mechanisches Hilfsmittel vorzugsweise eine Förderschnecke oder eine Pumpe in eine Vorrichtung zur Tropfenerzeugung befördert wird.
  6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, dass der Grundstoff pneumatisch in eine Vorrichtung zur Tropfenerzeugung befördert wird.
  7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung zur Tropfenbildung Teil eines Reaktionsgefäßes ist
  8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, dass aus dem Grundstoff durch Vibration, durch einen Luftstrom, durch eine Rotationsbewegung (Zentrifugalkräfte) und/oder durch Emulgieren Tropfen gebildet werden.
  9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8 dadurch gekennzeichnet, dass die gebildeten Tropfen chemisch, z.B. durch den Einfluss von Salzen gefällt werden können.
  10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9 dadurch gekennzeichnet, dass die gebildeten Tropfen physikalisch, z.B. durch Temperaturänderung gefällt werden können.
  11. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10 dadurch gekennzeichnet, dass die gefällten Tropfen die aus einem Organ gewonnenen lebenden Zellen enthalten.

12. Verfahren nach Anspruch 1 bis 11 dadurch gekennzeichnet, dass die gefällten Tropfen in dem Fällbad in Schwebe gehalten werden
13. Verfahren nach Anspruch 1 bis 12 dadurch gekennzeichnet, dass die gefällten Tropfen in dem Fällbad durch Rühren in Schwebe gehalten werden.
14. Verfahren nach Anspruch 1 bis 13 dadurch gekennzeichnet, dass die gefällten Tropfen in dem Fällbad durch die Fließgeschwindigkeit des umgebenden Mediums in Schwebe gehalten werden.
15. Verfahren nach Anspruch 1 bis 14 dadurch gekennzeichnet, dass die gefällten Tropfen durch Umspülen mit geeigneten Polymerlösungen beschichtet werden.
16. Verfahren nach Anspruch 1 bis 15 dadurch gekennzeichnet, dass die gefällten Tropfen während des Beschichtens in Schwebe gehalten werden
17. Verfahren nach Anspruch 1 bis 16 dadurch gekennzeichnet, dass die gefällten Tropfen während des Beschichtens durch Rühren in Schwebe gehalten werden.
18. Verfahren nach Anspruch 1 bis 17 dadurch gekennzeichnet, dass die gefällten Tropfen während des Beschichtens durch die Fließgeschwindigkeit des umgebenden Mediums in Schwebe gehalten werden.
19. Verfahren nach Anspruch 1 bis 18 dadurch gekennzeichnet, dass die beschichteten Kügelchen eine Hülle aufweisen, die den Kern und somit das verkapselte Material vollständig umschließt.
20. Verfahren nach Anspruch 1 bis 19 dadurch gekennzeichnet, dass die Hülle der beschichteten Kügelchen aus einer oder mehrerer radial angeordneten Schichten besteht.
21. Verfahren nach Anspruch 1 bis 20 dadurch gekennzeichnet, dass Schichten der Hülle Bereiche unterschiedlicher Dichte sein können.
22. Verfahren nach Anspruch 1 bis 21 dadurch gekennzeichnet, dass die beschichteten Kügelchen ungetrocknet, also feucht gelagert und verwendet werden können.

23. Verfahren nach Anspruch 1 bis 22 dadurch gekennzeichnet, dass die beschichteten Kügelchen gefriergetrocknet werden können.
24. Verfahren nach Anspruch 1 bis 23 dadurch gekennzeichnet, dass die beschichteten Kügelchen luftgetrocknet werden können.
25. Verfahren nach Anspruch 1 bis 24 dadurch gekennzeichnet, dass zum Füllen und/oder Beschichten eingesetzten Lösungen entweder als Konzentrate oder gebrauchsfertig, in verdünnter Form verwendet werden.
26. Anlage nach Anspruch 1, die nach einem Verfahren nach Anspruch 1 bis 25 arbeitet, dadurch gekennzeichnet, dass sie mehrere der folgenden Hauptkomponenten aufweist:
- Reaktionskammer zur Aufnahme des Organs mit Siebplatte und Rührwerk (RK)
  - Kälte- (KT) und Heizthermostat (HT)
  - Wärmetauscher zum Temperieren der Flüssigkeiten (WT1, WT2)
  - Dekantiergefäß mit poröser Fritte und Rohrdurchleitung (DK)
  - Kammer zur Trennung von markierten Gemischen im Magnetfeld (TK)
  - Mischbehälter für den Grundstoff und die Zellen (MI)
  - Vorratsbehälter für das Fällbad (VB1)
  - Vorratsbehälter für die Beschichtungslösungen (VB2, VB3, usw.)
  - Reaktionsgefäß für die Vertropfung und Fällung der Grundstoff-Zellsuspension (VR)
  - Vorrichtung zum Trocknen der beschichteten Kügelchen
  - Pumpen (P1, P2, P3) und Ventile (V1, V2,...)
  - Entsprechende Steuer- und Regelteile
27. Anlage nach Anspruch 1 bis 26 dadurch gekennzeichnet, dass sie gemäß Fig. 1 bzw. Fig. 1a arbeitet und/oder ihre Komponenten gemäß Fig. 1 bzw. Fig. 1a angeordnet und/oder miteinander verbunden sind.
28. Anlage nach Anspruch 1 bis 27 dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Zellisolutionsmodul besitzt, das gemäß Fig. 2 arbeitet und/oder dessen Komponenten gemäß Fig. 2 angeordnet und/oder miteinander verbunden sind.

29. Anlage nach Anspruch 1 bis 28 dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Zelltrennmodul besitzt, das gemäß Fig. 3 arbeitet und/oder dessen Komponenten gemäß Fig. 3 angeordnet und/oder miteinander verbunden sind.

30. Anlage nach Anspruch 1 bis 29 dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Zellverkapselungsmodul besitzt, das gemäß Fig. 4 arbeitet und/oder dessen Komponenten gemäß Fig. 4 angeordnet und/oder miteinander verbunden sind.

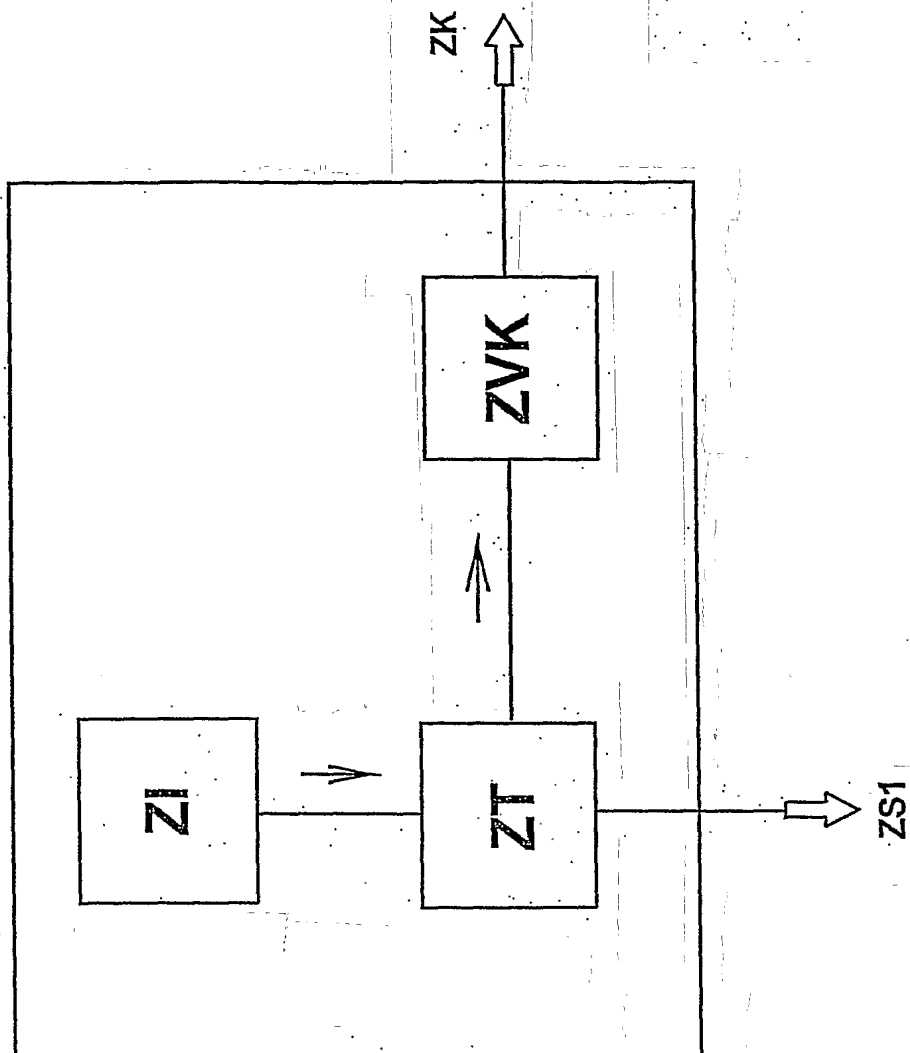


Fig. 1

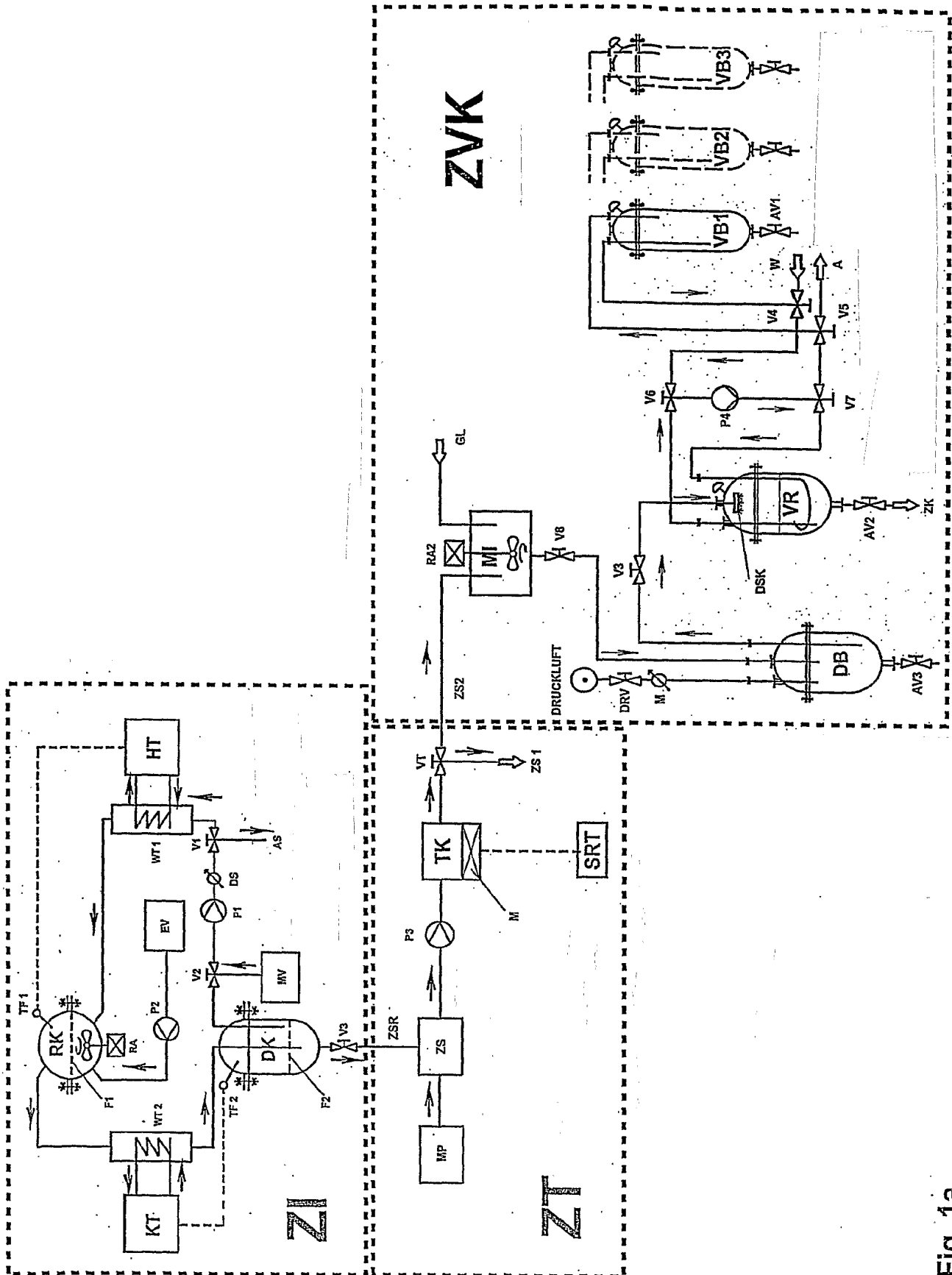
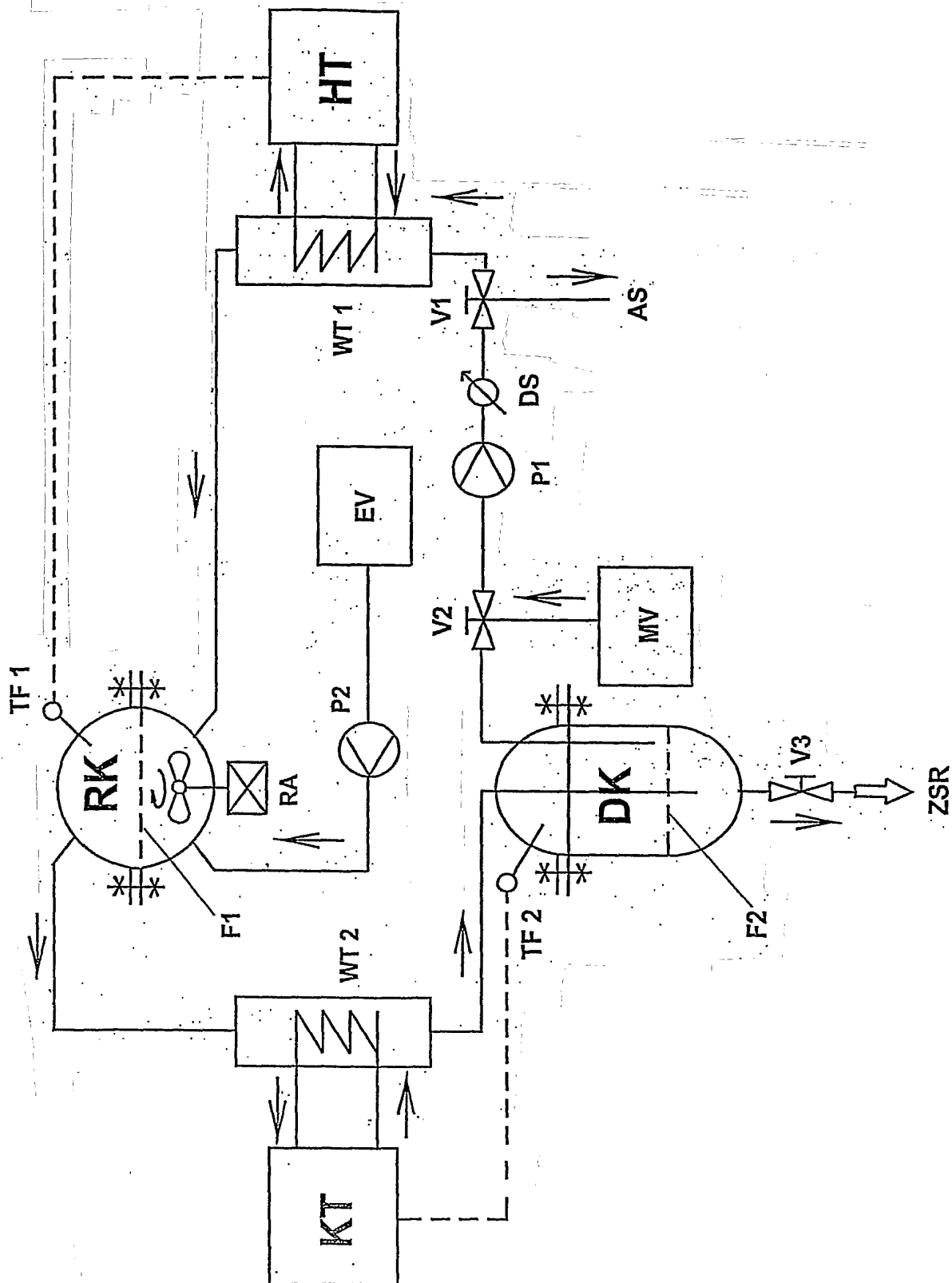
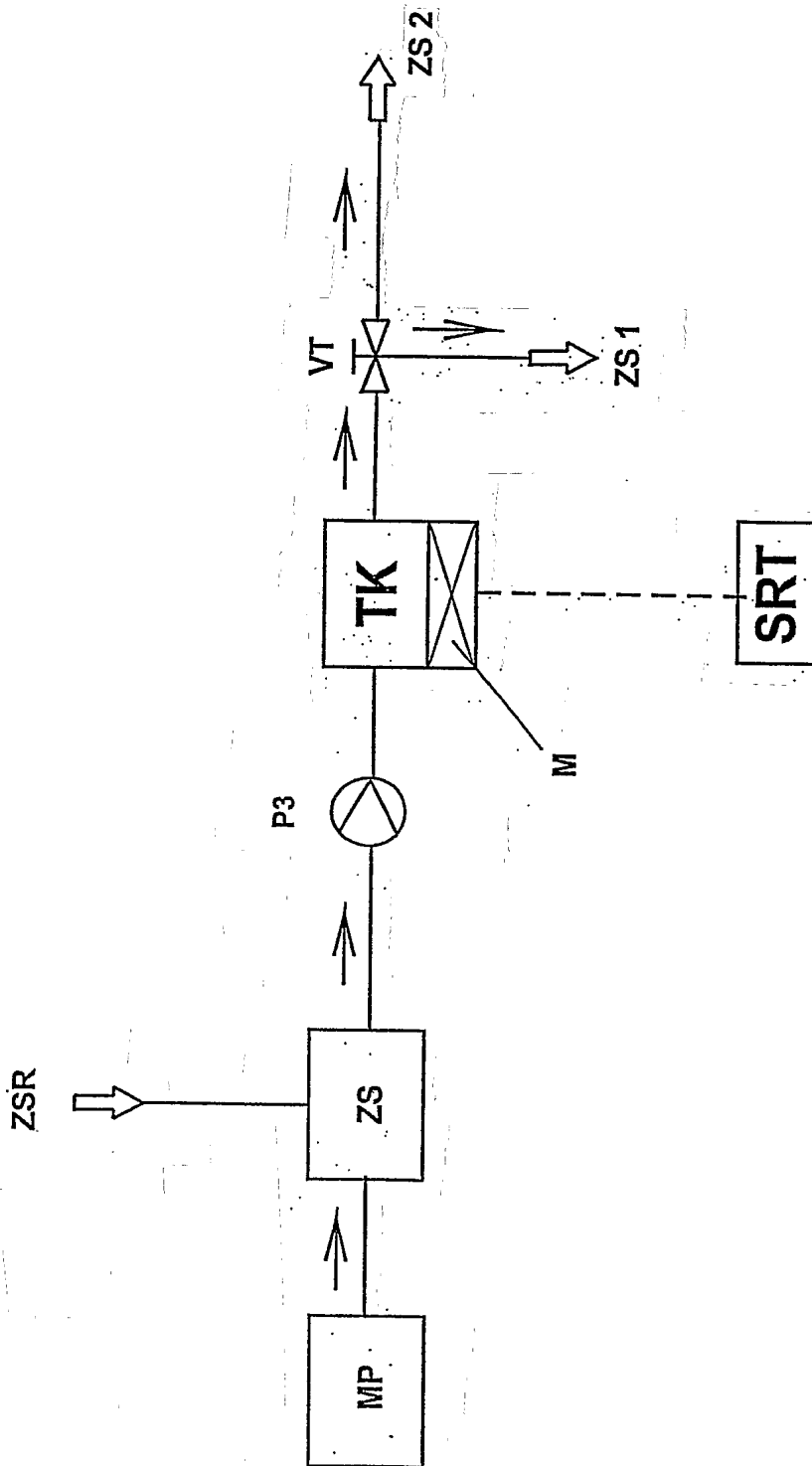


Fig. 1a







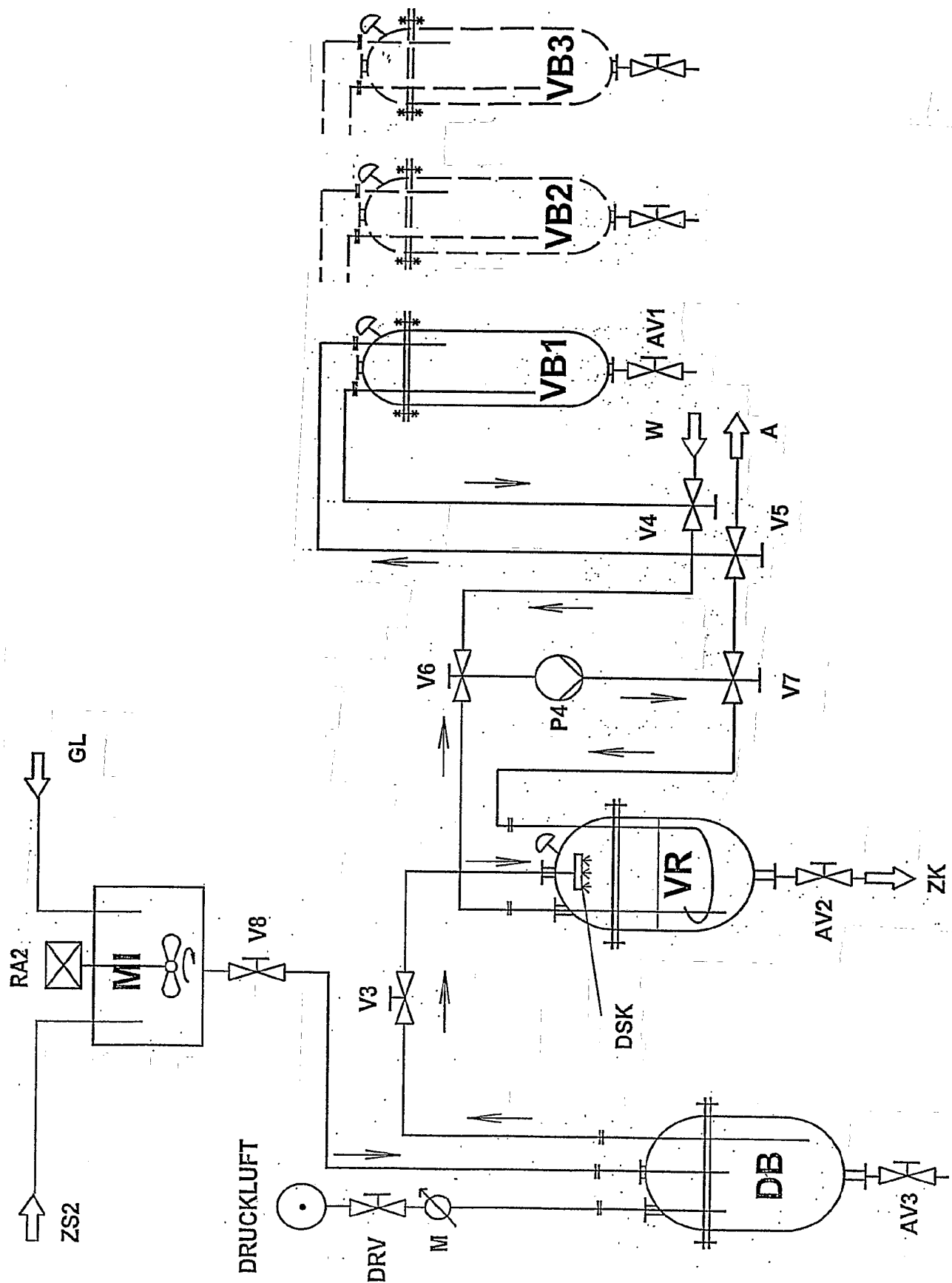


Fig. 4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/001893

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 7 C12N11/04 C12M3/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHNEIDER S ET AL: "Multilayer capsules: a promising microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 22, no. 14, 2001, pages 1961-1970, XP004245913 ISSN: 0142-9612 abstract page 1962, column 1, paragraph 1 - page 1963, column 1, paragraph 1 -----	1-3
X	US 5 912 163 A (BORLAND ET AL) 15 June 1999 (1999-06-15) abstract column 1, lines 37-60 column 2, lines 1-24 ----- -/--	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 June 2005

Date of mailing of the international search report

29. 07. 2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montrone, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/001893

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 868 121 A (SCHARP ET AL) 19 September 1989 (1989-09-19) abstract figures 5-7 column 2, lines 53-62 column 3, lines 10-17 column 4, line 12 - column 7, line 12 column 8, line 6 - column 9, line 42 -----	1-3, 26-29

**Box III**

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-3, 26-29 (all in part)

Method and installation for extracting living cells from organs, characterised in that the organ containing the cells is broken up in an enzymatic process into individual cells and/or cell aggregates, the relevant cells then being isolated from the cell mixture thus obtained and it then being possible to encapsulate said cells.

2. Claims 1-30 (all in part)

Method and installation for encapsulating living cells from organs, characterised in that the organ containing the cells is broken up in an enzymatic process into individual cells and/or cell aggregates, the relevant cells then being isolated from the cell mixture thus obtained and then being encapsulated.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/001893

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5912163	A	15-06-1999	NONE	
-----				
US 4868121	A	19-09-1989	DE 3650662 D1	05-02-1998
			DE 191613 T1	21-05-1987
			EP 0191613 A2	20-08-1986
			JP 61183226 A	15-08-1986
			US 5322790 A	21-06-1994
-----				

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N11/04 C12M3/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SCHNEIDER S ET AL: "Multilayer capsules: a promising microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, Bd. 22, Nr. 14, 2001, Seiten 1961-1970, XP004245913 ISSN: 0142-9612 Zusammenfassung Seite 1962, Spalte 1, Absatz 1 - Seite 1963, Spalte 1, Absatz 1	1-3
X	US 5 912 163 A (BORLAND ET AL) 15. Juni 1999 (1999-06-15) Zusammenfassung Spalte 1, Zeilen 37-60 Spalte 2, Zeilen 1-24 ----- -/--	1-3



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Juni 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29. 07. 2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Montrone, M



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 868 121 A (SCHARP ET AL) 19. September 1989 (1989-09-19) Zusammenfassung Abbildungen 5-7 Spalte 2, Zeilen 53-62 Spalte 3, Zeilen 10-17 Spalte 4, Zeile 12 - Spalte 7, Zeile 12 Spalte 8, Zeile 6 - Spalte 9, Zeile 42 -----	1-3, 26-29

## Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1-3, 26-29 (alle teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-3,26-29(alle teilweise)

Verfahren und Anlage zur Gewinnung von lebenden Zellen aus Organen dadurch gekennzeichnet, dass das Organ, das die Zellen enthält in einem enzymatischen Prozess in Einzelzellen und/oder Zellverbände zerlegt wird, aus dem so erhaltenen Zellgemisch anschliessend die relevanten Zellen abgetrennt werden und diese danach verkapselt werden können.

---

2. Ansprüche: 1-30(alle teilweise)

Verfahren und Anlage zur Verkapselung von lebenden Zellen aus Organen dadurch gekennzeichnet, dass das Organ, das die Zellen enthält in einem enzymatischen Prozess in Einzelzellen und/oder Zellverbände zerlegt wird, aus dem so erhaltenen Zellgemisch anschliessend die relevanten Zellen abgetrennt werden und diese danach verkapselt werden.

---

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2005/001893

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5912163	A	15-06-1999	KEINE		
US 4868121	A	19-09-1989	DE	3650662 D1	05-02-1998
			DE	191613 T1	21-05-1987
			EP	0191613 A2	20-08-1986
			JP	61183226 A	15-08-1986
			US	5322790 A	21-06-1994